

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/82, 15/53, 9/02, 5/10, G01N 33/50, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/04021</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Januar 1999 (28.01.99)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/03832 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 23. Juni 1998 (23.06.98) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 30 066.9 14. Juli 1997 (14.07.97) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Speyerer Wingert 25, D-67141 Neuhofen (DE). LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, D-68526 Ladenburg (DE). SCHMIDT, Ralf-Michael [DE/DE]; Am Schlossgarten 9d, D-67489 Kirchweiler (DE). KRUPINSKA, Karin [DE/DE]; Gyrhofstrasse 15, D-50931 Köln (DE). FALK, Jon [DE/DE]; Feldhuhnweg 23, D-50127 Bergheim (DE). <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, JP, KR, KZ, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> DNA SEQUENCE CODING FOR A HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE AND OVERPRODUCTION THEREOF IN PLANTS <b>(54) Bezeichnung:</b> DNA-SEQUENZ CODIEREND FÜR EINE HYDROXYPHENYLPYRUVATDIOXYGENASE UND DEREN ÜBERPRODUKTION IN PFLANZEN <b>(57) Abstract</b> The invention relates to a method for producing plants with an increased yield of vitamin E from biosynthesis by overexpression of a plant HPPD gene from barley. <b>(57) Zusammenfassung</b> Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen HPPD-Gens aus Gerste.		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

DNA-Sequenz codierend für eine Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase und deren Überproduktion in Pflanzen

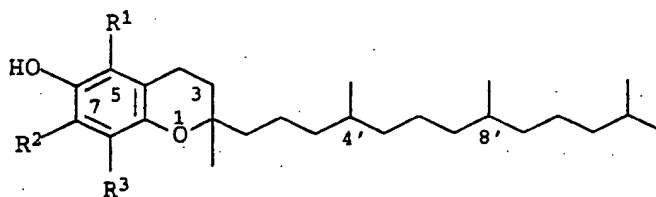
## 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Expression eines exogenen oder endogenen HPPD-Gens in Pflanzen oder Pflanzen-  
 10 teilen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der entsprechenden Nukleinsäuren kodierend für ein HPPD-Gen in trans- genen Pflanzen, um diese resistent gegenüber Hemmstoffen der HPPD zu machen, sowie die Verwendung der DNA-Sequenz codierend für eine HPPD zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung  
 15 von Inhibitoren der HPPD.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant wäre auch die Ent-  
 20 wicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's  
 25 Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a - d) stammt von Tocol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a - d):

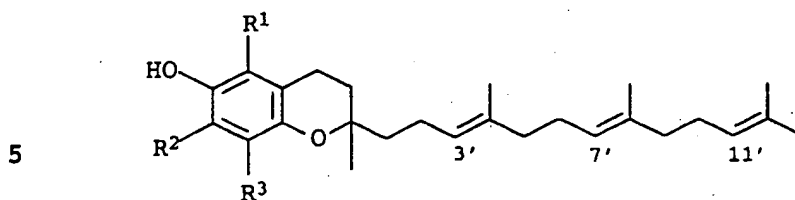
30



35

- 1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 1b,  $\beta$ -Tocopherol [148-03-8]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
 40 1c,  $\gamma$ -Tocopherol [54-28-4]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 1d,  $\delta$ -Tocopherol [119-13-1]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

45



- 2a,  $\alpha$ -Tocotrienol [1721-51-3]:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 10 2b,  $\beta$ -Tocotrienol [490-23-3]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
 2c,  $\gamma$ -Tocotrienol [14101-61-2]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 2d,  $\delta$ -Tocotrienol [25612-59-3]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt  $\alpha$ -Tocopherol.

15

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Vitamin E-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können  
 20 nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch  
 25 wäre die Erhöhung des Vitamin E Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

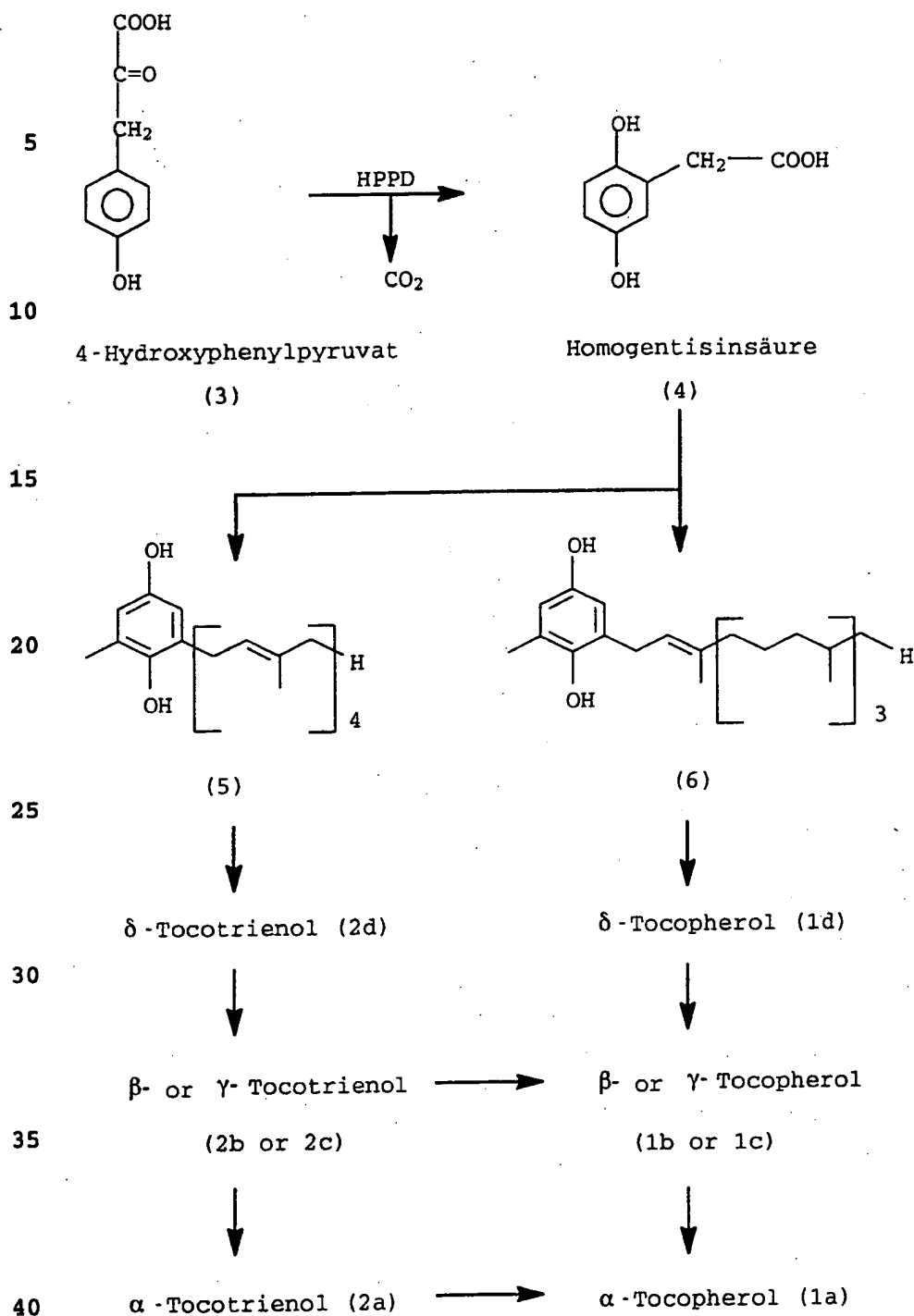
Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Vitamin E Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthese-  
 30 gen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

35

Die Tocopherol-Biosynthese in Pflanzen und Algen verläuft bekannt wie folgt:

40

45



Vorstufe des aromatischen Rings der Tocopherole ist p-Hydroxyphenylpyruvat (3), das enzymatisch mit Hilfe des Enzyms Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD) in Homogentisinsäure (4) umgewandelt wird, die mit Phytylpyrophosphat unter Eliminierung von CO<sub>2</sub> zur Vorstufe (6) reagiert. Der Tocotrienolbiosyntheseweg

## 4

beginnt mit der Kondensation von Homogentisinsäure(4) mit Geranylgeranylpyrophosphat zur Vorstufe (5). Die enzymatische Cyclisierung der Vorstufen 5 oder 6 führt zu  $\delta$  - Tocotrienol bzw. zu  $\delta$  - Tocopherol. Einige dieser Biosyntheseenzyme wurden isoliert.

## 5

Bei der Suche nach Arabidopsis-Mutanten, die Defekte in der Carotinoidbiosynthese aufweisen, wurde eine Mutante mit weißem Phänotyp identifiziert, die keine aktive HPPD bilden kann. Wenn die als *pds2* bezeichnete Mutante in Gegenwart von Homogentisinsäure  
 10 angezogen wird, bildet sie wie der Wildtyp Carotinoide und ergrünt (Norris et al., Plant Cell (1995) 7: 2139 - 2149). Diese Untersuchung zeigt, daß die Aktivität der HPPD Voraussetzung für die Ausbildung photosynthetisch aktiver Chloroplasten ist. Ohne dieses Enzym werden keine Plastochinone gebildet, die als Akzeptoren für freigesetzte Reduktionsäquivalente während der Carotinoidbiosynthese erforderlich sind (Phytoendesaturierung). Die Schlüsselrolle der HPPD im plastidären Stoffwechsel macht sie zu einem interessanten Target für Herbizide. Sulcotrione hemmen die Aktivität des Enzyms effektiv (Schultz et al., FEBS Lett. (1993)  
 20 318: 162 - 166).

Von den im folgenden genannten Organismen sind bereits Sequenzen HPPD spezifischer Gene bekannt:

## 25

## 30

## 35

Organismus	Sequenzname	Zugangsnummer Datenbank
Mensch	HPPD_HUMAN	X72389
Schwein	HPPD_PIG	D13390
Ratte	HPPD_RAT	M18405
Maus	HPPD_MOUSE	D29987
Streptomyces avermitilis	SA11864	U11864
Pseudomonas sp. strain P.J. 874	HPPD_PSESP	P80064
Arabidopsis	HPPD_ARAB1	AF900228
	HPPD_ARAB2	U89267

40 Desweiteren sind folgende Sequenzen mit deutlicher Homologie zu HPPD-Sequenzen in den Datenbanken zu finden:

PEA3\_MOUSE: Mus muscula (Maus) PEA3 polypeptide, AC X63190;

45 MELA\_SHECO: Shewanella colwelliana, mela Protein, AC M59289,

## 5

In WO 96/38567 wird die HPPD DNA-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* und *Daucus carota* beschrieben.

Sowohl für die Anwendung im Pflanzenschutz zur Erzeugung Herbi-  
5 zid-resistenter Pflanzen als auch für die Erhöhung der Vitamin  
E-Synthese in Pflanzen - beispielsweise zur Erzeugung von Futter-  
mitteln mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt - ist die Kenntnis der  
HPPD-DNA-Sequenzen unbedingte Voraussetzung.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer  
transgenen Pflanze mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung  
einer gegen Inhibitoren der HPPD resistenten transgenen Pflanze.

15 Beide Aufgaben wurden überraschenderweise gelöst durch die Über-  
expression eines HPPD-Gens in den Pflanzen.

Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Ent-  
20 wicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren  
der HPPD.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines HPPD-Gens  
aus Gerste in einer Pflanze bzw. einem Mikroorganismus und  
25 anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der HPPD-  
Enzymaktivität.

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die  
Klonierung des vollständigen HPPD-Gens aus Gerste über die  
30 Isolierung der für das HPPD-Gen spezifischen cDNA (HvSD36).

Während der Blattseneszenz tritt eine deutliche Erhöhung des  
Vitamin E-Gehalts in den Blättern auf (Rise et al., Plant  
Physiol. (1989) 89: 1028 - 1030). Das monokotyle Blatt der Gerste  
35 stellt einen Gradienten von Zellen unterschiedlichen Alters dar,  
da das Blatt ein basal gelegenes Meristem hat, von dem sich  
sukzessive neue Zellen abspalten. Somit liegen die ältesten  
Zellen an der Spitze des Blattes und die jüngsten an der Basis.  
Abb. 1 zeigt eine schematische Zeichnung des Primärblattes der  
40 Gerste an verschiedenen Tagen nach Aussaat. Die ermittelte  
Gesamtlänge der Blätter ist in der Skala links zu entnehmen.  
Eingezeichnet und mit I - IV benannt sind die für die Analyse  
der Genexpression ausgewählten verschieden weit differenzierten  
Blattbereiche des Primärblattes. Die Pflanzen wurden in einem  
45 täglichen Licht/Dunkel-Wechsel (L/D) angezogen bzw. zur Induktion  
der Seneszenz nach 6 Tagen abgeschnitten und für 2 Tage dunkel  
(2 nD) inkubiert. Eine "Northern blot"-Analyse mit RNA aus

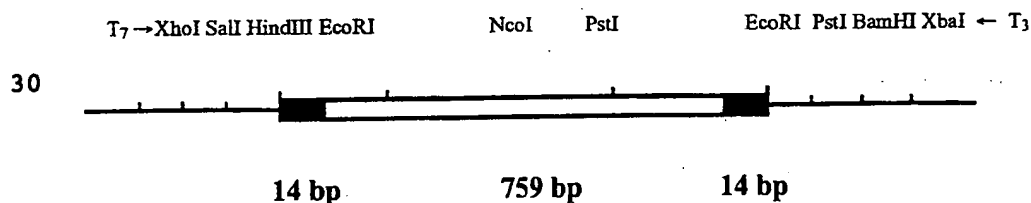


## 6

verschieden weit differenzierten Bereichen des Primärblattes der Gerste (siehe Abb. 2) deuten auf eine entwicklungsabhängig gesteuerte Expression der HPPD der Gerste hin. So findet eine starke Akkumulation des ca. 1600 nt langen Transkriptes im meristematischen Bereich an der Basis des Primärblattes (I) statt. Der Gehalt an diesem Transkript fällt mit zunehmendem Alter des Gewebes ab (IIa und IIb) und steigt in den voll ausdifferenzierten Zellen mit ausgereiften Chloroplasten (III) wieder an. In seneszierenden Bereichen des Primärblattes (IV) ist schließlich der Gehalt am 1600 nt langen Transkript am höchsten. Zusätzlich ist nur in den meristematischen Zellen an der Basis des Primärblattes ein ca. 3100 nt langes Transkript zu detektieren. Auch dieses Transkript ist in zunehmender Reifung des Gewebes nicht mehr nachweisbar.

Mit Hilfe des sogenannten "Differential Display"-Verfahrens wurde zunächst ein 207 bp cDNA-Fragment isoliert, dessen entsprechendes Transkript bei dunkelinduzierter Seneszenz im Primärblatt der Gerste akkumuliert. Dieses Fragment (Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: Nukleotidposition 1342 - 1549) wurde anschließend als Sonde verwendet, um in einer cDNA-Bank (in  $\lambda$ -ZAP-II) aus seneszierenden Fahnenblättern der Gerste einen cDNA-Klon mit größerem Insert zu isolieren.

Schematische Darstellung des cDNA-Teilklons HvSD 36 aus der  $\lambda$ -ZAP-II-Bank:



Das cDNA-Fragment (Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: Nukleotidposition 771 - 1529) wurde in die EcoRI Schnittstelle von pBluescript(SK-) kloniert. An beiden Enden der cDNA befindet sich zusätzlich eine 14 bp Adaptorsequenz, die zur Ligation in den  $\lambda$ -ZAP-II benötigt wurde. Eingezeichnet sind ausgewählte Restriktionsschnittstellen des Vektors sowie der cDNA selbst.

Das 759 bp lange cDNA-Fragment wurde als Sonde für einen weiteren Versuch verwendet, um eine vollständige Sequenz von HvSD 36 zu erlangen. Zu diesem Zweck stand eine cDNA Bank aus RNA des meristematischen Bereichs 5 Tage alter Gerstenkeimlinge zur Verfügung. Für diese cDNA Bank wurde der Lambda Phage ExCell Eco

RICIP von Pharmacia (Freiburg) (Produkt Nummer: 27-5011, 45.5kb) verwendet.

Es konnte ein 1565 bp langer cDNA-Klon isoliert werden, siehe  
5 Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: und 2.

Die 434 Aminosäuren lange Proteinsequenz weist unter den in den Datenbanken befindlichen Sequenzen mit 58 % die höchste Homologie zur Sequenz der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* auf.

10

Zur Auffindung eines genomischen Klonen, der die vollständige Gensequenz der HPPD beinhaltet, wurde eine Lambda FIXII-Bank der Gerste von der Firma Stratagene (Heidelberg, Produkt Nummer 946104) bezogen. Zur Herstellung der Bank diente DNA aus  
15 etiolierten Blättern der Wintergerste cv. Igri. Die DNA wurde partiell mit Sau3AI verdaut. Vor der Klonierung in die XhoI-Schnittstelle des Vektors erfolgte eine Auffüllung der Fragmentenden und der Phagenarme mit Nukleotiden. Die Durchmusterung der Bank mit 200.000 pfu in der ersten Runde ergab nur einen  
20 Klon, der mit der cDNA HvSD36 hybridisierte. Nach Restriktionsverdau dieses rekombinanten Phagen mit PstI und SacI konnten anschließend Fragmente mit Größen von 5400, 3800 und 1800bp isoliert werden, die bei einer "Southern"-Blot-Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde detektierbar sind. Diese Subfragmente liegen  
25 kloniert im Bluescript-Vektor vor. Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau des HPPD-Gens der Gerste.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Expressionskassetten, deren Sequenz für eine HPPD oder deren funktionelles Äquivalent  
30 kodiert, sowie deren Verwendung zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Vitamin E Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine erfindungsgemäße Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine HPPD kodieren  
35 und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Vitamin E verleihen.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der  
40 kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elementen  
45 te, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das HPPD-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor,

kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber  
 5 nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz  
 10 aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 - 8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 4  
 15 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
  - 20 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
  - PNOS: Nopalinn-Synthase-Promotor
  - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.
- 25 Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der  
 30 CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980) 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al.,  
 35 EMBO J. 8 (1989) 2195 - 2202).

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen HPPD-Gens in der Pflanze zu einem be-  
 40 stimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al.,  
 45 (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-

induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die  
5 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen  
die Biosynthese von Vitamin E bzw. dessen Vorstufen stattfindet.  
Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische  
Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der  
cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor  
10 aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremd-  
protein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten  
löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen  
15 exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995),  
1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher  
beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den  
Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al.  
Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor  
20 (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu  
exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der  
Aufbau einer derartigen Kassette ist in der Abbildung 4  
schematisch beispielhaft dargestellt.

25 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette  
erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer  
geeigneten HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen  
Promotor und HPPD-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein  
chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem  
30 Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und  
Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis,  
E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory  
Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY  
(1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist,  
35 Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory,  
Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al.,  
Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc.  
and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

40 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den  
Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das  
Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen ent-  
sprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment  
des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev.  
45 Plant Sci. 15, 4 (1996), 285 - 423). Für die Menge der Protein-  
akkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen

hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al. , Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792).

- Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren
- 5 DNA-Sequenz für ein HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des HPPD-Gens in die Chloroplasten vom HPPD-Teil
- 10 enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.
- 15 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine HPPD kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen
- 20 mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert
- 25 werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.
- 30 Zweckmäßigerweise können die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der
- 35 Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch
- 40 fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige DNA-Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig
- 45 austauschbar.

## 11

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine erfindungsgemäße Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den

## 12

transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die erfindungsgemäße Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines HPPD-Gens enthalten.

5

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine HPPD kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale,

10 beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

15 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184.

20 Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation

25 von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch

30 in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

35 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Vitamin E-Produktion eingesetzt werden.

40 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-

45 transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation

trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128 - 143 sowie in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711).

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte *Agrobakterien* können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein HPPD-Gen kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine HPPD kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.



## 14

- Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Vitamin E Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des HPPD-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-
- 5 Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die HPPD Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze
- 10 spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.
- 15 Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches HPPD-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Poly-
- 20 peptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf HPPD-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das HPPD-Protein an den
- 25 gewünschten Wirkort leitet.

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitpeptid und einem Polypeptid mit HPPD-Aktivität.

- 30 Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Vitamin E-Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des HPPD-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch
- 35 modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzen-generation.

- Der Biosyntheseort von Vitamin E ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des HPPD-Gens
- 40 sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Vitamin E-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze -beispielsweise in fett-
- haltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

## 15

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen HPPD-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

- 5 Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten HPPD-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des HPPD-Gens und deren Auswirkung auf die Vitamin E-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen  
10 getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher  
15 Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

20 Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

- Wie bereits erwähnt ist die HPPD ein geeignetes Target für Herbizide vom Typ der Sulcotrione. Um noch effizientere Hemm-  
25 stoffe der HPPD finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der HPPD aus Gerste in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli*  
30 überexprimiert.

Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte HPPD-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die HPPD spezifischen Hemmstoffen.

- 35 Dazu kann die HPPD beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der HPPD in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und  
40 quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide  
45 Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Sub-

## 16

stanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbizide, die mit dem 5 oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

Durch Überexpression der für eine HPPD kodierenden Gensequenz Seq ID NO: 1 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD erreicht. Die derart hergestellten 10 transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 15 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine erfindungsgemäße Expressionskassette in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 20 - Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher HPPD.
- 25 - Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.
- 30 - Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, 35 ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungs- 40 rungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombi- 45 nanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring

Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) 5 wurden von Stratagene bzw. Pharmacia im Fall von NP66 bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850 kann) wurde von Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Will- 15 mitzer, Plant Science 66 (1990) 221 - 230) benutzt werden.

#### Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem 20 Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

#### Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

25 In das Plasmid pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. (1984) 12, 8711) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment entsprechend den Nukleotiden 6909 - 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. Cell 21 (1980) 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 30 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835), Nukleotide 11749 - 11939 wurde als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors pBmAR-Hyg kloniert. Es entstand das 35 Plasmid pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221 - 230).

#### Anwendungsbeispiele

##### 40 Beispiel 1

#### Isolierung von HPPD-spezifischen cDNA Sequenzen

Mit Hilfe der von Liang und Pardee (Science (1992) 257, 967 - 45 972) publizierten Methode der DDRT-PCR wurde die Zusammensetzung der mRNA-Population aus Primärblättern von neun Tage in einem L/D-Wechsel (16 h Licht/ 8 h Dunkel) angezogenen Gerstenpflanzen

## 18

verglichen mit der von Primärblättern 11 Tage alter Gerstenpflanzen, in denen nach neun Tagen Anzucht anschließend Seneszenz durch zweitägige Dunkelbehandlung induziert wurde (Humbeck und Krupinska, J. Photochem. Photobiol. 36 (1996), 321 - 326).

- 5 Jeweils 0,2 µg der gesamten RNA wurde mit dem Enzym "Superskript RT" (Gibco BRL, Eggenstein) in cDNA umgesetzt. Dabei enthielten die Reaktionsansätze (20 µl) neben der RNA außerdem 20 µM dNTPs, 10 µM DTT, 1xRT-Puffer und je 1 µM (dT)<sub>12</sub>VN-Primer. Die Synthese der für diese Reaktionen erforderlichen Anker-"Primer" erfolgte
- 10 aufgrund der Angaben von Liang und Pardee:

1. 5'-TTTTTTTTTTTTTAG-3'
2. 5'-TTTTTTTTTTTTTCA-3'
3. 5'-TTTTTTTTTTTTTAC-3'
- 15 4. 5'-TTTTTTTTTTTTTGT-3'

Nach Synthese der cDNAs erfolgte die Amplifikation der entsprechenden Sequenzen in jeweils zehn Ansätzen, die sich durch Verwendung der im folgenden angegebenen Zufalls-"Primer" unter-

20 scheiden:

- |                        |                      |
|------------------------|----------------------|
| 1. 5'-TACAACGAGG-3'    | 2. 5'-GGAACCAATC-3'  |
| 3. 5'-AAACTCCGTC-3'    | 4. 5'-TGGTAAAGGG-3'  |
| 5. 5'-CTGCTTGATG-3'    | 6. 5'-GTTTTCGCAG-3'  |
| 25 7. 5'-GATCTCAGAC-3' | 8. 5'-GATCTAACCG-3'  |
| 9. 5'-GATCATGGTC-3'    | 10. 5'-GATCTAAGGC-3' |

Die PCR-Reaktionsansätze enthielten in einem Volumen von jeweils 20 µl 1xPCR-Puffer, 2 µM dNTPs, 2,5 µCi (α <sup>33</sup>P)-dATP, 1 µM

30 (dT)<sub>12</sub>VN-"Primer", 1/10 Vol. RT-Mix (Sambrook et al. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 1989), 1 U Taq DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) und 1 µM 10-mer Zufalls-"Primer". Die PCR-Reaktionen liefen nach folgendem Programm in einem Uno-Block (Biometra) ab:

- 35
1. 94°C 2 min
  2. 94°C 30 s
  3. 40°C 2 min
  4. 72°C 30 s
  - 40 5. 72°C 5 min
  6. 4°C Aufbewahrung bis zur weiteren Bearbeitung

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden 40-mal nacheinander durchgeführt. Dabei ergaben sich etwa 100 cDNA-Banden pro Reaktion und

45 "Primer"-Kombination.

## 19

Abweichend von der Vorschrift von Liang und Pardee erfolgte die Auftrennung der amplifizierten cDNA-Fragmente in nichtdenaturierenden Polyacrylamidgelen folgender Zusammensetzung: 6 % (w/v) Acrylamid (Long Ranger, AT Biochem), 1,2 x TBE-Puffer, 0,005 % (v/v) TEMED und 0,005 % (w/v) APS (Bauer et al, Nucl. Ac. Res. (1993) 21, 4272 - 4280).

- Je 3,5 µl jedes PCR-Ansatzes wurden mit 2 µl Probenpuffer (dye II, Sambrook et al., 1989) versetzt und dann auf das Gel aufgetragen.
- 10 Um die Reproduzierbarkeit der cDNA-Bandenmuster zu erfassen (Abb. 5), wurden von an den Tagen 9 und 11 geernteten Primärblättern der Gerste jeweils zwei unabhängige RNA-Präparationen angefertigt (9 und 9' bzw. 11 und 11') und parallel in der nachfolgenden Analyse eingesetzt. Dargestellt ist das Ergebnis für zwei
- 15 verschiedene Primerkombinationen (A und B), wobei exemplarisch zwei Unterschiede im Bandenmuster zwischen der Probe von Tag 9 und 11 durch Pfeile hervorgehoben wurden. Nur solche Banden, die in den beiden Proben aus seneszierenden Pflanzen gleichermaßen und in den beiden Vergleichsproben nicht vorkamen, wurden bei der
- 20 späteren Analyse der Gele beachtet. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 2,5 h bei 40 Watt (0,8 W/cm<sup>3</sup>) in 1 x TBE-Puffer. Nach erfolgter Trennung der cDNA-Fragmente wurde das Gel auf Filterpapier (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Nach Trocknung des Gels bei 50°C wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. cDNA-
- 25 Banden, die im Autoradiogramm nur bei den Proben 11 und 11' auftraten, wurden mittels eines Skalpells aus dem trockenen Gel herausgeschnitten und die DNA durch Kochen in 100 µl 1 x TE-Puffer eluiert. Die mit Ethanol gefällte DNA wurde für die weiteren Untersuchungen in 10 µl Wasser resuspendiert. Nach Reamplifikation
- 30 mit den für diesen Ansatz zuvor verwendeten "Primern" konnte die DNA kloniert und sequenziert sowie auch als Sonde für Northern-Blot-Hybridisierungen eingesetzt werden.

Um zu prüfen, ob das entsprechende cDNA-Fragment tatsächlich ein

35 seneszenzspezifisch auftretendes Transkript repräsentiert, erfolgten Hybridisierungen mit RNA aus Blättern verschiedener Entwicklungsstadien:

- A. 1. RNA aus Primärblättern von 9 Tage im L/D-Wechsel
- 40 angezogenen Pflanzen
- A. 3. RNA aus Primärblättern von 10 Tage alten Pflanzen, bei deren Anzucht am Tag 10 die Lichtphase ausfiel
- 45 A. 4 RNA aus Primärblättern von 11 Tage alten Pflanzen, die am Tag 10 und 11 keine Lichtphase mehr hatten

## 20

- A. 5 RNA aus Primärblättern von 12 Tage alten Pflanzen, die nach 2 Tagen Dunkelheit wieder eine Lichtphase erfahren haben
- 5 Die Proben für die RNA-Analyse wurden jeweils in der Mitte der ursprünglichen Nachtphase geerntet.
- B. RNA aus Fahnenblättern, die zu sieben verschiedenen Zeitpunkten im Freiland gesammelt wurden (Abb. 6). Die Blätter waren am 29. Mai voll ausgewachsen und wiesen am 21. Juni weniger als 10 % des ursprünglichen Chlorophyllgehalts auf. Der Beginn der Seneszenzprozesse ist in Abbildung 6 durch einen Pfeil angegeben (d.h. 17 Tage nach Erreichen der vollen Länge am 15. Juni). Als Seneszenzbeginn wurde der Tag definiert, an dem die Photosystem II-Effizienz abnahm (Humbeck et al., Plant Cell Environment (1996) 19: 337 - 344).
- 10
- 15
- Zur Hybridisierung eines Filters mit den beschriebenen RNA-Proben wurde neben der HPPD-Sonde zum Vergleich auch eine spezifische Sonde für das *rbcS*-Gen, das für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase kodiert, eingesetzt. Abbildung 6 zeigt die Hybridisierung der "Northern-Blots" A und B mit der cDNA HvSD36 und einer für das *rbcS*-Gen spezifischen Sonde.
- 20
- 25 Filter A trägt RNA aus Primärblättern der Gerste nach 9 Tagen Anzucht im L/D-Wechsel (9), nach anschließender ein- bzw. zweitägiger Dunkelinkubation (10, 11) und nach daran anschließender erneuter Belichtung für einen Tag (12). Filter B enthält RNA aus Fahnenblättern, die 1992 im Zeitraum vom 29.05. bis 21.06. im Freiland geerntet wurden. Der Pfeil gibt den Beginn der Sequenz am 15.06. an. Wie aus der Abbildung 6 ersichtlich, ist die Menge an *rbcS*-spezifischer mRNA dann hoch, wenn die Menge an der für die HPPD spezifischen mRNA relativ gering ist. Die für die HPPD spezifische mRNA ist in Primärblättern neun Tage alter Pflanzen vor dem Transfer ins Dunkel nicht nachweisbar und akkumuliert deutlich während der Dunkelphase. Bei Wiederbelichtung der Pflanzen nimmt die Menge an dieser mRNA deutlich ab. Im Fall der Fahnenblätter sind bereits in voll ausgewachsenen, nicht seneszenten Blättern geringe Mengen der für die HPPD spezifischen mRNA nachweisbar. Zu einer verstärkten Expression kommt es bereits 4 Tage vor dem eigentlichen Seneszenzbeginn. Die höchste Menge dieser mRNA liegt in seneszenten Blättern vor. Ein Größenvergleich mit bekannten RNA-Spezies ergab, daß das mit der cDNA-Sonde HvSD36 (S: Seneszenz; D:Dunkel, Fragmentnummer 36 im DDRT-Gel) detektierte Transkript eine Länge von ca. 1,6 kb aufweist.
- 30
- 35
- 40
- 45

## 21

Durch DDRT-PCR wurden unabhängig voneinander drei cDNA-Fragmente erhalten, die dieses Expressionsmuster ergaben und aufgrund der Sequenzanalyse tatsächlich dasselbe Transkript repräsentieren. Das längste Fragment hatte eine Größe von 230 bp. Das 230 bp große PCR-Produkt wurde schließlich mit dem "Sure Clone™ Ligation Kit" (Pharmacia, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde in kompetente Zellen des E. coli-Stamms DH5  $\alpha$  transformiert. Da das Fragment, methodisch bedingt, das 3'-Ende des zugehörigen Transkripts repräsentiert, reichte die Sequenzinformation zunächst nicht aus, um eine eindeutige Homologie mit einer Sequenz in den Datenbanken ausfindig zu machen. Um eine längere zugehörige cDNA zu isolieren, wurde eine Lambda ZAPII-Bank (Stratagene, Heidelberg) aus RNA seneszenten Farnenblätter unter Verwendung des 230 bp großen Fragments als Sonde durchmustert. Für diesen Arbeitsschritt erfolgte eine Markierung der Sonde mit Dig-dUTP nach Angaben des "DNA-Labeling and Detection Kit" (Boehringer, Mannheim). Die Untersuchung der Bank erfolgte nach dem Protokoll des "ZAP-cDNA Synthesis Kit" (Stratagene, Heidelberg).

Im Fall der hier beschriebenen Sonde wurden 150.000 pfu überprüft. Davon gaben 39 Phagenplaques ein positives Signal. Davon wurden 12 Phagenpopulationen weiter bearbeitet. Nach einer Phagenpräparation konnten die inserierten Fragmente über PCR angereichert und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch Southern-Blot Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde wurden aus den so behandelten 12 Phagenpopulationen diejenigen ausgewählt, die die größten "Inserts" mit positivem Signal aufwiesen. Nach erneutem Ausplattieren wurden die Phagen einer weiteren Hybridisierung unterzogen. Vereinzelte Phagenplaques wurden ausgestochen und nach Elution unter Verwendung eines Helferphagen einer *In vivo* Excision nach dem Protokoll von Stratagene (Exassist™ Interference-Resistant Helper Phage with SOLR™ Strain) unterzogen. Die aus dieser Behandlung hervorgehenden sogenannten "Phagemide" enthalten die im pBLueskript (SK-) klonierte cDNA.

Nach einer anschließenden Plasmidpräparation konnte das betreffende "Insert" mit EcoRI aus dem Bluescript-Plasmid herausgeschnitten werden. Der im Fall der HvSD36 cDNA erhaltene cDNA-Klon enthält ein "Insert" mit einer Größe von ca. 800 bp. Die vollständige Sequenzierung der cDNA erfolgte mit dem "SequiTherm Excel Long-Read DNA-Sequenzierungs-Kit" (Epicentre Technologies, Biozym Diagnostic, Oldendorf) unter Verwendung von mit IRD41 markierten Universal-"Primern", die an Sequenzbereiche im Bluescript-Vektor binden. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte über den Infrarotlaser des automatischen Sequenzierers 4000L.



## 22

der Firma Licor. Nach Sequenzierung lag eine genau 759 bp lange Sequenz vor, die an den Seiten von einer jeweils 14 bp langen Adaptorsequenz flankiert ist. Diese Adaptorsequenzen dienten bei der Herstellung der cDNA-Bank zur Ligation der cDNA-Fragmente mit 5 den Armen des Phagen Lambda ZAPII (Stratagene, Heidelberg).

Die Proteinsequenz HvSD36, die insgesamt über 180 Aminosäuren verfügt, weist unter den in den Datenbanken befindlichen Sequenzen mit 41 % die höchste Homologie zur Sequenz der HPPD 10 des Menschen auf. In Anbetracht der Länge des im "Northern-Blot" detektierten Transkripts (ca. 1600 nt) ist anzunehmen, daß von der cDNA noch 850-900 bp fehlen.

Zur Vervollständigung der cDNA wurde eine weitere cDNA Bank untersucht. Aus dem basalen meristematischen Bereich 5 Tage alter 15 Gerstenkeimlinge wurde mit Hilfe von "Dynabeads" (Dynal, Hamburg) mRNA isoliert und mit dem "Time Saver cDNA SyntheseKit" (Pharmacia, Freiburg) in cDNA überschrieben. Es folgte eine Ligation von EcoRI/NotI-Adaptoren (Pharmacia, Freiburg) an die cDNA mit 20 anschließender Ligation in den Lambda ExCell Vektor (Pharmacia, Freiburg). Schließlich wurde die rekombinante Phagen-DNA mit Hilfe des "Gigapack II Gold Set" (Stratagene, Heidelberg) in Phagenproteine verpackt. Mit der 759 bp langen Sonde HvSD36 wurden 400000 pfu überprüft, wobei 5 Phagen von der Sonde 25 detektiert wurden. Eine Excision der "Phagemids" aus dem Phagen erfolgte in vivo mit Hilfe des Bakterienstammes NP66 nach den Angaben von Pharmacia (Freiburg). Aus einzelnen Bakterienkolonien wurden die rekombinanten pExCell-Plasmide isoliert und zur Vermehrung in den Bakterienstamm D115  $\alpha$  überführt.

30

Der längste auf diesem Weg isolierte cDNA-Klon HvSD36 hat eine Länge von 1565 bp und wurde vollständig sequenziert (siehe Sequenzprotokoll).

## 35 Beispiel 2

## Charakterisierung der genomischen Sequenz

Zur Auffindung eines genomischen Klones, der die Gensequenz der 40 HPPD beinhaltet, wurde eine Lambda FIXII-Bank der Gerste von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen. Zur Herstellung der Bank diente DNA aus etiolierten Blättern der Wintergerste cv. Igri. Die DNA wurde partiell mit Sau3AI verdaut. Vor der Klonierung in die XhoI-Schnittstelle des Vektors erfolgte eine Auffüllung der 45 Fragmentenden und der Phagenarme mit Nukleotiden. Die Durchmusterung der Bank mit 200.000 pfu in der ersten Runde ergab nur einen Klon, der mit der cDNA HvSD36 hybridisierte. Nach

## 23

Restriktionsverdau dieses rekombinanten Phagen mit PstI und SacI konnten anschließend Fragmente mit Größen von 5400, 3800 und 1800 bp isoliert werden, die bei einer "Southern"-Blot-Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde detektierbar sind. Diese Subfragmente liegen kloniert im Bluescript-Vektor vor.

Die Durchmusterung der Bank erfolgte nach der für die HybondN-Membran angegebenen Vorschrift. Die Markierung der Sonde für die Durchmusterung der Bank sowie für "Southern"-Blot-Hybridisierungen erfolgte über "Random Priming" mit  $^{32}\text{P}$ -dATP unter Verwendung des Klenow-Enzyms (Sambrook et al., (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Es wurde ein genomischer "Southern-Blot" mit gesamter DNA aus Gerste (Carina) durchgeführt (Abb. 7). Je 15 µg DNA wurden mit BamHI (B), EcoRI (E), HindIII (H) oder XbaI (X) verdaut und in einem 0.75 % Agarose Gel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Hybond N+ Membran (Amersham, Braunschweig) erfolgte eine Hybridisierung mit der unvollständigen 759bp langen cDNA Sonde von HvSD36 nach Angaben des Herstellers der Membran. Dabei konnten folgende Fragmente detektiert werden:

BamHI: 6.0, 3.9 und 3.0 kbp  
 EcoRI: >10kbp  
 HindIII: 8.3, 2.6, 1.1 und 1.0 kbp  
 XbaI: 9.0, 5.2 und 4.2kbp

Die Längen der Fragmente wurden durch Vergleich mit einem DNA-Größenstandard (Kb-Leiter von GibcoBRL, Eggenstein) abgeschätzt.

## Beispiel 3

## Homologievergleich der Proteinsequenz von HvSD36

Ein Vergleich der Proteinsequenz von HvSD36 mit Proteinsequenzen in den Datenbank ergab Homologien zu folgenden bisher bekannten Proteinsequenzen:

	10	20	30	40	50
40 HPPD_Hv	.....	.....	.....	.....MP	PTPTTPAATG
HPPD_Ath	.....	.....	.....	.....MGHQNA	VSENQNHDDG
HPPD_HUMAN	.....	.....	.....	.....	.....
HPPD_RAT	.....	.....	.....	.....	.....
HPPD_PIG	.....	.....	.....	.....	.....
45 HPPD_MOUSE	.....	.....	.....	.....	.....
HPPD_PSESP	.....	.....	.....	.....	.....
MELA_SHECO	.....	.....	.....	.....	.....
PEA3_MOUSE	MTKSSNHNCL	LRPENKPLW	GPGAQAASLR	PSPATLVVSS	PGHAEHPPAA

## 24

	60	70	80	90	100
HPPD_Hv	AAAAVTPEHA	RPHRMVRFNP	RSDRFHTLSF	HHVEFWCADA	ASAAGRFAFA
HPPD_Ath	AASSPGFKLV	GFSKFVRKNP	KSDKFKVKRF	HHIEFWCGDA	TNVARRFSWG
HPPD_HUMAN	M	TTYSDKGAKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCSK
HPPD_RAT		YWDKGPKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCNK
5 HPPD_PIG	M	TSYSDKGEKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASYYCSK
HPPD_MOUSE	M	TTYNNKGPKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCNK
HPPD_PSESP			ADLYENP	MGLMGFEFIE	LASPTPTNLE
MELA_SHECO			MASEQNP	LGLLGIEFTE	FATPDLDFMH
PEA3_MOUSE	PAQTPGPQVS	ASARGPGPVA	GGSGRMERRM	KGGYL---DQ	RVPTYFCSKS
	110	120	130	140	150
10 HPPD_Hv	LGAPLAARSD	LSTGNSAHAS	QLLRSGSLAF	LFT--APYAN	G-CDAA----
HPPD_Ath	LGMRFSAKSD	LSTGNMVAS	YLLTSGDLRF	LFT--APYSP	S-LSAGEIKP
HPPD_HUMAN	MGFEPLAYRG	LETGSREVVS	HVIKQGKIVF	VLS--SA---	-----LNP
HPPD_RAT	MGFEPLAYKG	LETGSREVVS	HVIKQGKIVF	VLC--SA---	-----LNP
HPPD_PIG	IGFEPLAYKG	LETGSREVVS	HVVKQDKIVF	VFS--SA---	-----LNP
HPPD_MOUSE	MGFEPLAYRG	LETGSREVVS	HVIKRGKIVF	VLC--SA---	-----LNP
15 HPPD_PSESP	PIFEIMGFTK	VATHRSKDV-	HLRQGAINGL	ILN--NE---	-----
MELA_SHECO	KVFIDFGFSK	LKKHKQKDI-	VYYKQNDINF	LLN--NE---	-----
PEA3_MOUSE	PGNGSLGEAL	MVPQGLMDP	GSLPPSDSED	LFQDLSHFQE	TWLAEAQVPD
	160	170	180	190	200
HPPD_Hv	--TASLPSFS	ADAARRFSAD	HGIAVRVSAL	RVADAAEAFR	ASRRRGARPA
HPPD_Ath	TTTASIPSPD	HGSCRSFFSS	HGLGVRVAI	EVEDAESAFS	ISVANGAIPS
20 HPPD_HUMAN	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDYIVQ	KARERGAkim
HPPD_RAT	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCEHIVQ	KARERGAkiv
HPPD_PIG	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDYIVQ	KARERGAiiv
HPPD_MOUSE	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDHIVQ	KARERGAkiv
HPPD_PSESP	-----P	HSVASFYAAE	HGPSVCGMAF	RVKDSQKAYK	RALELGAQPI
MELA_SHECO	-----K	QGFSAQFAKT	HGPAISSMGW	RVEDANFAFE	GAVARGAKPA
25 PEA3_MOUSE	SDEQFVPDFH	---SENLAFFH	SPTTRIKKEP	QSPRTDPALS	CSRKPPLPYH
	210	220	230	240	250
HPPD_Hv	FAPV-----	-----DLGRG	FAPAEVELYG	--DVVLRVFS	HP--DG--TD
HPPD_Ath	SPPI-----	-----VLNEA	VTIAEVKLYG	--DVVLRVFS	YKAEDT--EK
HPPD_HUMAN	REP-----	-WVEQDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KMN-----YI
30 HPPD_RAT	REP-----	-WVEEDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KIN-----YT
HPPD_PIG	REEVC-CAAD	VRGHHTPLDR	AR-----QVWE	--GT-----LVE	KMT-----FC
HPPD_MOUSE	REP-----	-WVEQDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KIN-----YT
HPPD_PSESP	HI-----	-----ETGPME	LNLPAIKGIG	--GAPLYLID	RFGESSSIYD
MELA_SHECO	AD-----	-----EV--KD	LPYPAIYGIG	--DSLIFYID	TFGDDNNIYT
PEA3_MOUSE	HGEQCLYSRQ	IAIKSPAPGA	PGQSPLQPF	RAEQQSSLLR	ASSSSQSHPG
	260	270	280	290	300
35 HPPD_Hv	VPFLPGFEGV	TNPDA-----	VDYGLTRFDH	VVGNVP--EL	-APAAAYIAG
HPPD_Ath	SEFLPGFERV	EDASSF---P	LDYGIRRLDH	AVGNVP--EL	-GPALTYVAG
HPPD_HUMAN	GQFLPGYEAP	AFMDPLLPKL	PKCSLEMIDH	IVGNQPDQEM	-VSASEW---
HPPD_RAT	GRFLPGFEAP	TYKDTLLPKL	PSCNLEIIDH	IVGNQPDQEM	-ESASEW---
HPPD_PIG	LDSRPQPSQT	LLHRLLSKL	PKCGLLEIIDH	IVGNQPDQEM	-ESASQW---
40 HPPD_MOUSE	GRFLPGFEAP	TYKDTLLPKL	PRCNLEIIDH	IVGNQPDQEM	-QSASEW---
HPPD_PSESP	IDFV--FLEG	VDRHPVGA--	---GLKIIDH	LTHNVYGRM	-A---YWANF
MELA_SHECO	SDF-----EA	LDEPIITQ--	-EKGFIEVDH	LTNNVHKGTM	-E---YWSNF
PEA3_MOUSE	HGYLGEHSSV	FQQPVDMCHS	FTSPQGGGRE	PLPAPYQHQL	SEPCPPYPQQ
	310	320	330	340	350
HPPD_Hv	FT---GFHEF	AEFTAEDVGT	TESGLNSVVL	ANNSEGVLLP	LNPEVHGTRK
45 HPPD_Ath	FT---GFHQF	AEFTADDVGT	AESGLNSAVL	ASNDENVLLP	INPEVHGTRK
HPPD_HUMAN	YLKNLQFHRF	WSVDDTQVHT	EYSSLSRIVV	ANYEESIKMP	INEPAPG-KK
HPPD_RAT	YLKNLQFHRF	WSVDDTQVHT	EYSSLSRIVV	ANYEESIKMP	INEPAPG-RK
HPPD_PIG	YMRNLQFHRF	WSVDDTQIHT	EYSALRSVVM	ANYEESIKMP	INEPAPG-KK

## 25

	HPPD_MOUSE	YLKLNQFHRF	WSVDDTQVHT	EYSSLRISIV	TNYEESIKMP	INEPAPG-RK
	HPPD_PSESP	YEKLFNFREI	RYF---DIKG	EYTGLTSKAM	TAPDGMIRIP	LNE--ESSKG
	MELA_SHECO	YKDIFGFTEV	RYF---DIKG	SQTALISYAL	RSPDGSFCIP	INE--GKGDD
	PEA3_MOUSE	NFKQ-EYHDP	LYEQAGQPAS	SQGGVSGHRY	PGAGVVIKQE	RTDFAYDSDV
		360	370	380	390	400
5	HPPD_Hv	RSQIQTFLEH	HGGPGVQH-I	AVASSDVLRT	LKMRARSAM	GGFDLPPPL
	HPPD_Ath	KSQIQTYLEH	NEGAGLQH-L	ALMSDIFRT	LREMRKRSSI	GGFDFMPSP
	HPPD_HUMAN	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIITA	IRHLRER---	-GLEFLSVP-
	HPPD_RAT	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALRTEDIITT	IRHLRER---	-GMEFLAVP-
	HPPD_PIG	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIITA	IRSLRER---	-GVEFLAVP-
	HPPD_MOUSE	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIITA	IRHLRER---	-GTEFLAAP-
10	HPPD_PSESP	AGQIEEFMLQ	FNGEGIQH-V	AFLSDDLKT	WDHLKSI---	-GMRFMTAPP
	MELA_SHECO	RNQIDEYLKE	YDGPVQH-L	AFRSRDIVAS	LDAMEGS---	-SIQTLDIIP
	PEA3_MOUSE	PGCASMYLHP	EGFSGPSPGD	GVMGYGYEKS	LRFPDPDVC	VPKKFEGDIK
		410	420	430	440	450
	HPPD_Hv	PKYYEGVRR	AGD--VLSEA	QIKECQELGV	LVDRDDQG--	--VLL-----
15	HPPD_Ath	PTYYQNLKKR	VGD--VLSDD	QIKECEELGI	LVDRDDQG--	--TLL-----
	HPPD_HUMAN	STYYKQLREK	LKTAKIKVKE	NIDALEELKI	LVDDYDEKG--	--YLL-----
	HPPD_RAT	SSYYRLLREN	LKTSKIQVKE	NMDVLEELKI	LVDDYDEKG--	--YLL-----
	HPPD_PIG	FTYYKQLQEK	LKSAKIRVKE	SIDVLEELKI	LVDDYDEKG--	--YLL-----
	HPPD_MOUSE	SSYYKLLREN	LKSAKIQVKE	SMDVLEELHI	LVDDYDEKG--	--YLL-----
	HPPD_PSESP	DTYYEMLEGR	LPN---HGE	PVGELQARGI	LLDGSSSESGD	KRLL-----
	MELA_SHECO	E-YYDTIFEK	LPQ---VTE	DRDRIKHQI	LVDDGEDG--	--YLL-----
20	PEA3_MOUSE	QEGIGAFREG	PPYQ-----	-RGALQLWQF	LVALLDPTN	AHFIWTGRC
		460	470	480	490	500
	HPPD_Hv	QIFTKPVGDR	PTLFLEMIQR	IGCMKDERG	EE----YQKG	GCGGFGKGNF
	HPPD_Ath	QIFTKPLGDR	PTIFIEIIQR	VGCMKDEEG	KA----YQSG	GCGGFGKGNF
	HPPD_HUMAN	QIFTKPVQDR	PTLFLEVIQR	HNHQ-----	-----	---GFGAGNF
25	HPPD_RAT	QIFTKPMQDR	PTLFLEVIQR	HNHQ-----	-----	---GFGAGNF
	HPPD_PIG	QIFTKPMQDR	PTVFLEVIQR	NNHQ-----	-----	---GFGAGNF
	HPPD_MOUSE	QIFTKPMQDR	PTLFLEVIQR	HNHQ-----	-----	---GFGAGNF
	HPPD_PSESP	QIFSETLMGP	--VFFEFIQR	----KGDD-	-----	---GFGEGNF
	MELA_SHECO	QIFTKNLFGR	--IFIEIIQR	----KNNL-	-----	---GFGEGNF
	PEA3_MOUSE	MEFKLIEPEE	VARLWGIQKN	RPAMNYDKLS	RSLRYYYEKG	IMQKVAGERY
		510	520	530	540	550
30	HPPD_Hv	-----SE	LFK-SIE-DY	--EKS--LEA	KQSAAV-QGS	
	HPPD_Ath	-----SE	LFK-SIE-EY	--EKT--LEA	KQLVG	
	HPPD_HUMAN	-----NS	LFK-AFEEEEQ	--NLRGNLTN	METNGVVPGM	
	HPPD_RAT	-----NS	LFK-AFEEEEQ	--ALRG		
	HPPD_PIG	-----NS	LFK-AFEEEEQ	--ELRGNLTD	TDPNGVPFRL	
35	HPPD_MOUSE	-----NS	LFK-AFEEEEQ	--ALRGNLTD	LEPNGVRSKM	
	HPPD_PSESP	-----KA	LFE-SIERDQ	--VRRGVLST	-D	
	MELA_SHECO	-----KA	LFE-SIERDQ	--VRRGVL		
	PEA3_MOUSE	VYKFVCEPEA	LFSLAFPDNQ	RPALKAEFDR	PVSEEDTVPL	SHLDESPAYL
		560	570			
40	HPPD_Hv					
	HPPD_Ath					
	HPPD_HUMAN					
	HPPD_RAT					
	HPPD_PIG					
	HPPD_MOUSE					
	HPPD_PSESP					
45	MELA_SHECO					
	PEA3_MOUSE	PELTGPAPPF	GHRGGYSY			

## 26

- Erläuterung: HPPD\_Hv: *Hordeum vulgare* 4-hydroxyphenylpyruvate  
dioxygenase (HvSD36)  
HPPD\_Ath: *Arabidopsis thaliana* 4-hydroxyphenylpy-  
ruvate dioxygenase  
5 HPPD\_HUMAN: *H.sapiens* 4-hydroxyphenylpyruvate  
dioxygenase  
HPPD\_PIG: Pig 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase  
HPPD\_RAT: Rat F alloantigen  
HPPD\_MOUSE: Mouse 4-hydroxyphenylpyruvate dioxy-  
10 genase  
MELA\_SHECO: *S. colwelliana* mela protein  
HPPD\_PSESP: *Pseudomonas* sp. (strain P.J.874)  
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase  
PEA3\_MOUSE: *Mus musculus* (mouse) PEA3 polypeptide  
15
- Die größte Homologie wurde zu der *Arabidopsis* Sequenz  
gefunden mit 58 % über die gesamte Sequenz (62 % über 412  
As), gefolgt von HPPD\_RAT mit 35 % (über 365 As),  
HPPD\_HUMAN 34 % (über 365 AS), HPPD\_MOUSE 34 % (über 371  
20 As).

## Beispiel 4

Anzucht von Gerste (*Hordeum vulgare*)

- 25 Gerstensetzlinge (*Hordeum vulgare* L., cv. Carina, Ackermann Saat-  
zucht, Irbach, Germany) wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen  
unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer in sogenann-  
ten Mitscherlich-Töpfen in Erde, die 4 g pro Liter Osmocote 5M  
(Urania, Hamburg, Germany) enthielt, angezogen. Um einheitliches  
30 Wachstum sicherzustellen, wurden die Samen auf feuchtem Filterpa-  
pier im Dunkeln für 2 Tage bei 4°C und 1 Tag bei 21°C ausgekeimt  
und nur solche Setzlinge eingesetzt, die gleiches Längenwachstum  
der Primärwurzel zeigten. Nach dem Transfer dieser Setzlinge auf  
Erde wurden diese mit 1.5 cm gesiebter Erde bedeckt. Danach wur-  
35 den die Pflanzen über 9 Tage bei 16 Stunden Licht ( $120 \mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )  
und 8 Stunden Dunkelheit verbunden mit einem Temperaturschift  
(21°C bei Tag, 16°C bei Nacht) inkubiert. Um Seneszenz zu induzie-  
ren, werden die Pflanzen nach 9 Tagen für 2 Tage (Tag 10 und 11)  
im Dunkeln bei der obengenannten Temperatur gehalten.

40

## Beispiel 5

Anzucht von Tabak

- Die Tabakpflanzen wurden nach bekannter Methode angezogen. Die  
45 verwendete Tabaksorte ist *Nicotiana tabacum*, cv. Xanthi.

## Beispiel 6

## Transformation von Tabak

Die erfindungsgemäße Expressionskassette enthaltend das HPPD-Gen  
5 mit der Sequenz 1 wurde in den Vektor pBinAR-Hyg kloniert  
(Abb. 4). Mit diesem Vektor wurden Tabakpflanzen gemäß Beispiel 5  
anschließend nach bekannter Methode transformiert..

## Beispiel 7

## 10 Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Tabak

Die cDNA der HPPD wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und  
in Tabak unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert.  
Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolin-  
15 genes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Tabaksamen  
zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte  
Tabakpflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend  
wurde der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen  
der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha$ -Tocopherol-  
20 konzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze  
erhöht.

25

30

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 67056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698

(ii) ANMELDETITEL: HPPD Sequenz aus Gerste

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1565 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: hppd aus Gerste
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: senescence

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: lambda FIXII-Bank der Gerste
- (B) CLON: pHvSD36.seq

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 9..1313

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTEL:

- (A) AUTORS: Krupinska, Karin
- (B) TITEL: Overexpression of HPPD
- (C) ZEITSCHRIFT: overexpression of HPPD

29

(G) DATUM: 1998

(K) BELANGREICHE RESTE IN SEQ ID NO: 1: VON 1 BIS 1565

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCACACC ATG CCG CCC ACC CCC ACC ACC CCC GCG GCT ACC GGC GCC GCC	50
Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Ala Ala	
1 5 10	
GCC GCG GTG ACG CCG GAG CAC GCG CGA CCG CAC CGA ATG GTC CGC TTC	98
Ala Ala Val Thr Pro Glu His Ala Arg Pro His Arg Met Val Arg Phe	
15 20 25 30	
AAC CCG CGC AGC GAC CGC TTC CAC ACG CTC TCC TTC CAC CAC GTC GAG	146
Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ser Phe His His Val Glu	
35 40 45	
TTC TGG TGC GCG GAC GCC GCC TCC GCC GCC GGC CGC TTC GCG TTC GCG	194
Phe Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ala Phe Ala	
50 55 60	
CTC GGC GCG CCG CTC GCC GCC AGG TCC GAC CTC TCC ACG GGG AAC TCC	242
Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser	
65 70 75	
GCG CAC GCC TCC CAG CTG CTC CGC TCG GGC TCC CTC GCC TTC CTC TTC	290
Ala His Ala Ser Gln Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu Ala Phe Leu Phe	
80 85 90	
ACC GCG CCC TAC GCC AAC GGC TGC GAC GCC GCC ACC GCC TCC CTG CCC	338
Thr Ala Pro Tyr Ala Asn Gly Cys Asp Ala Ala Thr Ala Ser Leu Pro	
95 100 105 110	
TCC TTC TCC GCC GAC GCC GCG CGC CGG TTC TCC GCC GAC CAC GGG ATC	386
Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Arg Phe Ser Ala Asp His Gly Ile	
115 120 125	
GCG GTG CGC TCC GTA GCG CTG CGC GTC GCA GAC GCC GCC GAG GCC TTC	434
Ala Val Arg Ser Val Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala Ala Glu Ala Phe	
130 135 140	
CGC GCC AGT CGT CGA CGG GGC GCG CGC CCG GCC TTC GCC CCC GTG GAC	482
Arg Ala Ser Arg Arg Arg Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Val Asp	
145 150 155	
CTC GGC CGC GGC TTC GCG TTC GCG GAG GTC GAG CTC TAC GGC GAC GTC	530
Leu Gly Arg Gly Phe Ala Phe Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val	
160 165 170	
GTG CTC CGC TTC GTC AGC CAC CCG GAC GGC ACG GAC GTG CCC TTC TTG	578
Val Leu Arg Phe Val Ser His Pro Asp Gly Thr Asp Val Pro Phe Leu	
175 180 185 190	



30															
CCG GGG TTC GAG GGC GTA ACC AAC CCG GAC GCC GTG GAC TAC GGC CTG															626
Pro Gly Phe Glu Gly Val Thr Asn Pro Asp Ala Val Asp Tyr Gly Leu															
	195							200					205		
ACG CGG TTC GAC CAC GTC GTC GGC AAC GTC CCG GAG CTT GCC CCC GCC															674
Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Ala Pro Ala															
	210						215						220		
GCA GCC TAC ATC GCC GGG TTC ACG GGG TTC CAC GAG TTC GCC GAG TTC															722
Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe															
	225					230						235			
ACG GCG GAG GAC GTG GGC ACG ACC GAG AGC GGG CTC AAC TCG GTG GTG															770
Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val															
	240					245						250			
CTC GCC AAC AAC TCG GAG GGC GTG CTG CTG CCG CTC AAC GAG CCG GTG															818
Leu Ala Asn Asn Ser Glu Gly Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val															
	255				260				265					270	
CAC GGC ACC AAG CGC CGG AGC CAG ATA CAG ACG TTC CTG GAA CAC CAC															866
His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu Glu His His															
		275						280					285		
GGC GGC CCG GGC GTG CAG CAC ATC GCG GTG GCC AGC AGT GAC GTG CTC															914
Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Val Ala Ser Ser Asp Val Leu															
	290						295						300		
AGG ACG CTC AGG AAG ATG CGT GCG CGC TCC GCC ATG GGC GGC TTC GAC															962
Arg Thr Leu Arg Lys Met Arg Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Asp															
	305					310						315			
TTC CTG CCA CCC CCG CTG CCG AAG TAC TAC GAA GGC GTG CGA CGC CTT															1010
Phe Leu Pro Pro Pro Leu Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Leu															
	320					325						330			
GCC GGG GAT GTC CTC TCG GAG GCG CAG ATC AAG GAA TGC CAG GAG CTG															1058
Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu															
	335				340				345				350		
GGT GTG CTC GTC GAT AGG GAC GAC CAA GGG GTG TTG CTC CAA ATC TTC															1106
Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe															
		355						360					365		
ACC AAG CCA GTA GGG GAC AGG CCG ACC TTG TTC CTG GAG ATG ATC CAG															1154
Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu Met Ile Gln															
	370						375						380		
AGG ATC GGG TGC ATG GAG AAG GAC GAG AGA GGG GAA GAG TAC CAG AAG															1202
Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Glu Glu Tyr Gln Lys															
	385						390						395		

31

GGT GGC TGC GGC GGG TTC GGC AAA GGC AAC TTC TCC GAG CTG TTC AAG 1250  
 Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys  
 400 405 410

TCC ATT GAA GAT TAC GAG AAG TCC CTT GAA GCC AAG CAA TCT GCT GCA 1298  
 Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Ala  
 415 420 425 430

GTT CAG GGA TCA TAGGATAGAA GCTGGTCCTT GTATCATGGT CTCATGGAGC 1350  
 Val Gln Gly Ser  
 435

AAAAGAAAAC AATGTTGTTT GTAATATGCG TCGCACAATT ATATCAATGT TATAATTGGT 1410

GAAGCTGAAG ACAGATGTAT CCTATGTATG ATGGGTGTAA TGGATGGTAG AGGGGCTCAC 1470

ACATGAAGAA AATGTAGCGT TGACATTGTT GTACAATCTT GCTTGCAAGT AAAATAAAGA 1530

ACAGATTTTG AGTTCTGCAA AAAAAAAAAA AAAAA 1565

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 434 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Val Thr Pro Glu His Ala Arg Pro His Arg Met Val Arg Phe Asn Pro  
 20 25 30

Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp  
 35 40 45

Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ala Phe Ala Leu Gly  
 50 55 60

Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His  
 65 70 75 80

Ala Ser Gln Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala  
 85 90 95

Pro Tyr Ala Asn Gly Cys Asp Ala Ala Thr Ala Ser Leu Pro Ser Phe  
 100 105 110

Ser Ala Asp Ala Ala Arg Arg Phe Ser Ala Asp His Gly Ile Ala Val  
 115 120 125

32

Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Glu	Ala	Phe	Arg	Ala	130	135	140
Ser	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala	Pro	Val	Asp	Leu	Gly	145	150	155
Arg	Gly	Phe	Ala	Phe	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	165	170	175
Arg	Phe	Val	Ser	His	Pro	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	180	185	190
Phe	Glu	Gly	Val	Thr	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	195	200	205
Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	210	215	220
Tyr	Ile	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Glu	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	225	230	235
Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ala	245	250	255
Asn	Asn	Ser	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Val	His	Gly	260	265	270
Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Phe	Leu	Glu	His	His	Gly	Gly	275	280	285
Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Thr	290	295	300
Leu	Arg	Lys	Met	Arg	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Gly	Gly	Phe	Asp	Phe	Leu	305	310	315
Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Val	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	325	330	335
Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Glu	Leu	Gly	Val	340	345	350
Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	355	360	365
Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Leu	Phe	Leu	Glu	Met	Ile	Gln	Arg	Ile	370	375	380
Gly	Cys	Met	Glu	Lys	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Glu	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	385	390	395
Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Glu	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	405	410	415

33

Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Ala Val Gln  
420 425 430

Gly Ser

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenz SEQ ID NO:1 und damit hybridisierende DNA-  
5 Sequenzen kodierend für eine HPPD.
2. Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine  
DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.
- 10 3. Expressionskassette nach Anspruch 2, enthaltend den CaMV35S-  
Promotor.
4. Expressionskassette nach Anspruch 2, enthaltend den samen-  
spezifischen Phaseolin-Promotor.
- 15 5. Expressionskassette nach Anspruch 2, wobei die DNA-Sequenz  
gemäß Anspruch 1 funktionell mit einem anderen Protein so  
verknüpft ist, daß ein gemeinsames Translationsprodukt ent-  
steht.
- 20 6. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur  
Transformation von Pflanzen.
7. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekenn-  
25 zeichnet, daß man eine Expressionskassette gemäß Anspruch 2  
in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze  
oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
8. Verfahren zur Transformation von Pflanzen, dadurch gekenn-  
30 zeichnet, daß man
  - 1) die Expressionskassette nach Anspruch 2 in einen Agro-  
bakterienstamm transferiert,
  - 2) die entstandenen rekombinanten Klone isoliert und
  - 35 3) diese zur Transformation von Pflanzen verwendet.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Transformation mit Hilfe  
des Stammes *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt.
- 40 10. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der  
Elektroporation erfolgt.

## 35

11. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der particle bombardment Methode erfolgt.
- 5 12. Pflanze mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 2 bis 5.
13. Pflanze gemäß Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.
- 10 14. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 in Pflanzen exprimiert wird.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz in einer Tabakpflanze exprimiert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression in den Blättern oder den Samen der Pflanze
- 20 erfolgt.
17. Verwendung von Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 2 bis 5 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1
- 25 in Pflanzen.
18. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.
- 30 19. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.
- 35 20. Herbizide Wirkstoffe, identifizierbar mittels eines Testsystems gemäß Anspruch 19.
21. Verwendung einer Pflanze gemäß Anspruch 12 zur Herstellung pflanzlicher HPPD.
- 40 22. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.
- 45

36

23. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.

5 24. Pflanze mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 2 bis 5.

10

15

20

25

30

35

40

45

1/7

Fig. 1/7

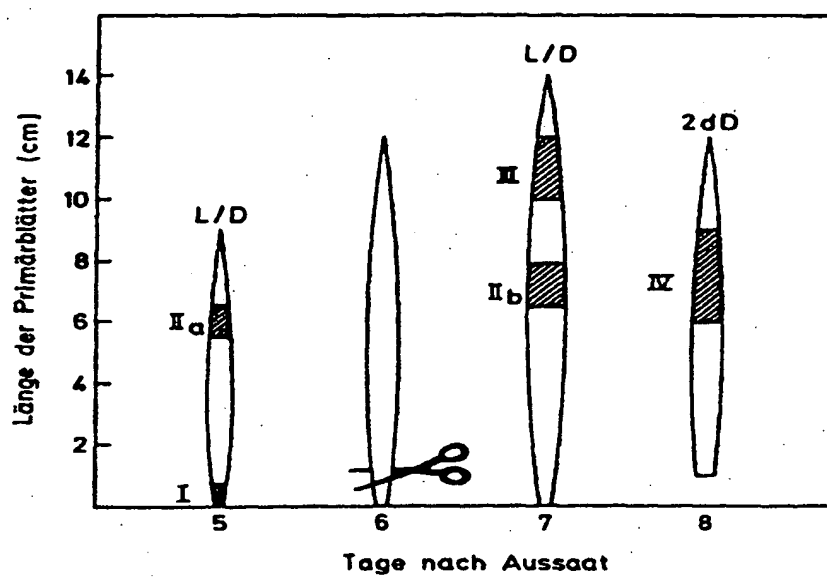
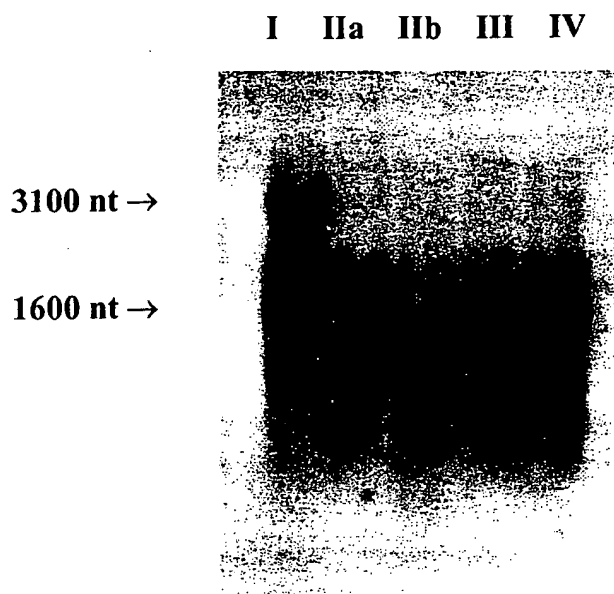




Fig. 2/7



3/7

Fig. 3/7

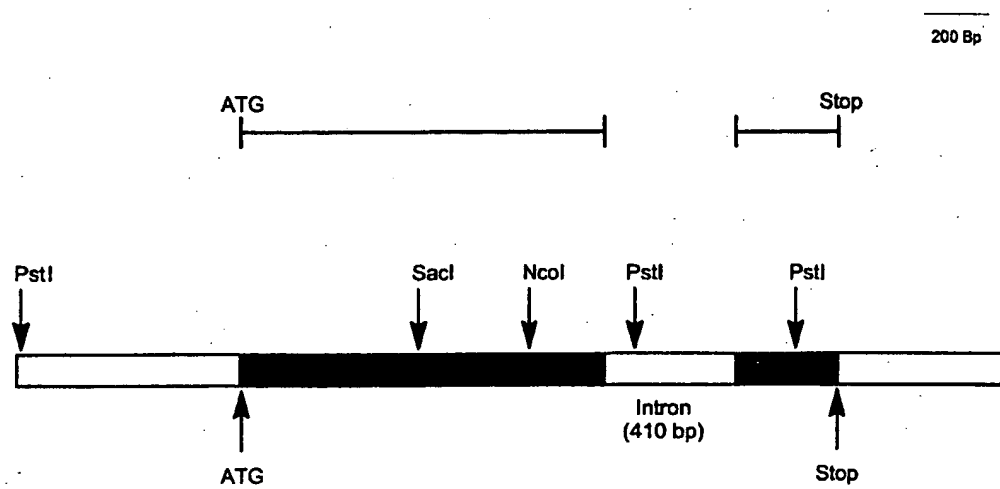
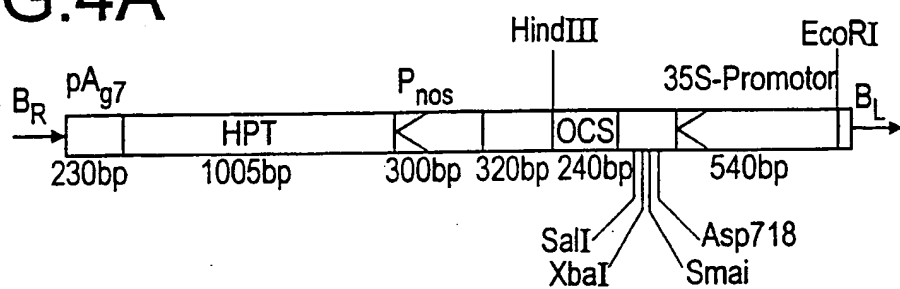


Fig. 4/7

## FIG.4A



## FIG.4B

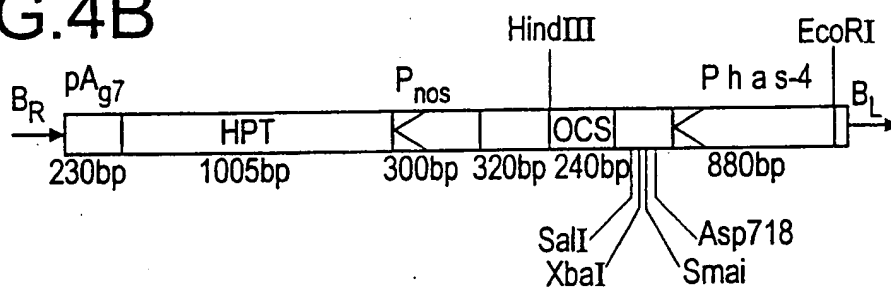
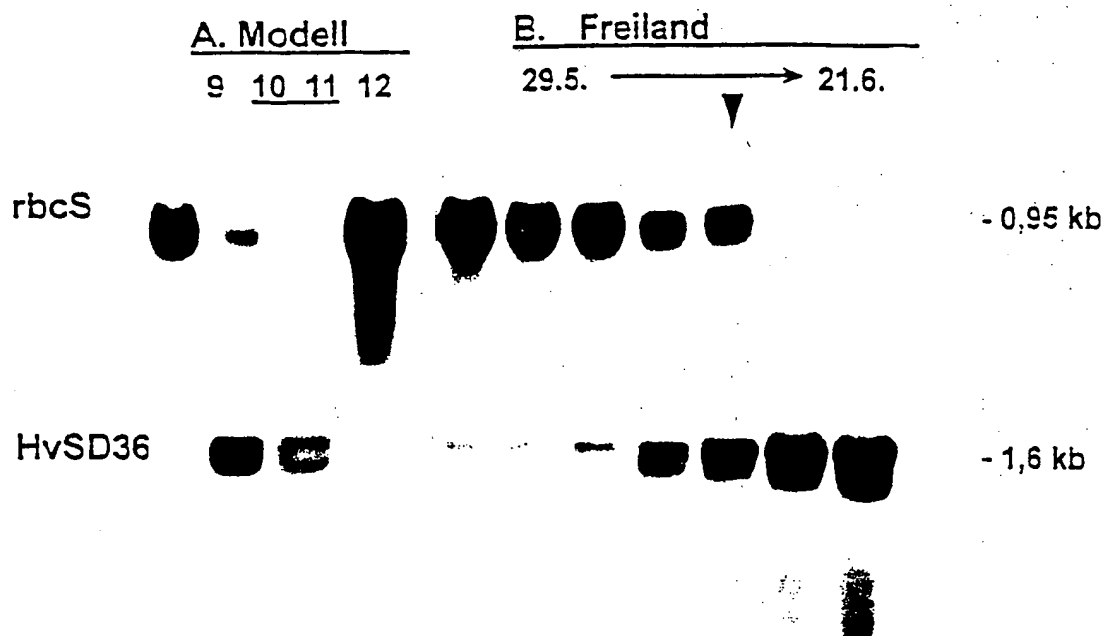


Fig. 5/7



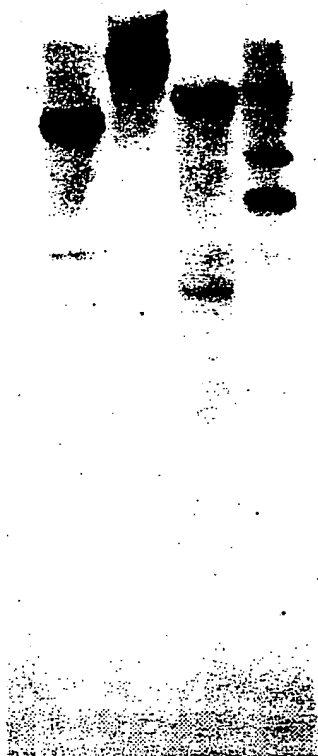
Fig. 6/7



7/7

Fig. 7/7

B E H X



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. itional Application No

PCT/EP 98/03832

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/53 C12N9/02 C12N5/10 G01N33/50  
A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N G01N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ; SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR);) 5 December 1996 cited in the application	1-3, 6-11, 22-24
Y	pages 1, 2; example	18-20
X	NORRIS, S.R., ET AL. : "arabidopsis plastoquinone and tocopherol biosynthetic mutants are also carotenoid deficient" PLANT PHYSIOLOGY, SUPPLEMENT, vol. 111, no. 2, June 1996, page 40 XP002083334	1-3, 6-12, 14, 16, 17, 21
Y	see the whole document	18-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 1998

Date of mailing of the international search report

27/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International Application No

PCT/EP 98/03832

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARTA I C ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXOGENASE FROM MAIZE" PESTICIDE SCIENCE, vol. 48, no. 2, 1996, pages 109-116, XP000646540 pages 109, 110, left hand-column; page 115 ---	20
X	LENNE C ET AL: "LOCALIZATION AND PARTIAL PURIFICATION OF P-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE FROM CULTURED CARROT CELLS" PHOTOSYNTHESIS: FROM LIGHT TO BIOSPHERE. PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL PHOTOSYNTHESIS CONGRESS, vol. 5, 20 August 1995, pages 285-288, XP000646348 see page 288 ---	1
Y	"LARGE SCALE TESTING OF 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXUGENASE FOR THE DETECTION OF NEW HERBICIDAL LEADS" RESEARCH DISCLOSURE, no. 393, January 1997, page 73 XP000693711 see the whole document ---	18-20
A	NORRIS S R ET AL: "GENETIC DISSECTION OF CAROTENOID SYNTHESIS IN ARABIDOPSIS DEFINES PLASTOQUINONE AS AN ESSENTIAL COMPONENT OF PHYTOENE DESATURATION" PLANT CELL, vol. 7, December 1995, pages 2139-2149, XP002041909 abstract, page 2140, left hand column; page 2141, right hand column; pages 2142, 2143; figures 3, 4, 7 ---	1-24
P, X	KLEBER-JANKE, T. AND KRUPINSKA, K.: "isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions" PLANTA, vol. 203, November 1997, pages 332-340, XP002083335 abstract, page 337,; page 339, figures 2, 4; table 2 ---	1
P, X	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 July 1997  pages 4, 6, 7-10, 14, 24, 26; claims --- -/--	1-3, 6-12, 14, 16-19, 21



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ernational Application No

PCT/EP 98/03832

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 97 49816 A (DU PONT ;MAXWELL CARL ARTHUR (US); SCOLNIK PABLO ARIEL (US); WITTE) 31 December 1997  abstract, page 2; page 3, lines 9-16; pages 10, 11, 14, 15; examples	1-3, 6-11, 18-20, 22-24
P,X	GARCIA I ET AL: "SUBCELLULAR LOCALIZATION AND PURIFICATION OF A P-HYDROXYPHENYLPYRU-VATE DIOXYGENASE FROM CULTURED CARROT CELLS AND CHARACTERIZATION OF THE CORRESPONDING CDNA" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 325, no. PART 03, 1 August 1997, pages 761-769, XP002070560 pages 761, 764; 763, right hand column; pages 766, 767; figure 3	1,2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/EP 98/03832

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9638567 A	05-12-1996	FR 2734840 A	06-12-1996
		FR 2734841 A	06-12-1996
		FR 2734842 A	06-12-1996
		AU 6228696 A	18-12-1996
		CA 2219979 A	05-12-1996
		CZ 9703809 A	18-03-1998
		EP 0828837 A	18-03-1998
		HR 960245 A	31-08-1997
		PL 323679 A	14-04-1998
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A	20-08-1997
WO 9749816 A	31-12-1997	AU 3644697 A	14-01-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03832

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 C12N15/82 C12N15/53 C12N9/02 C12N5/10 G01N33/50 A01H5/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N G01N A01H		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ; SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR);) 5. Dezember 1996 in der Anmeldung erwähnt	1-3, 6-11, 22-24
Y	Seite 1,2; Beispiele	18-20
X	NORRIS, S.R., ET AL. : "arabidopsis plastoquinone and tocopherol biosynthetic mutants are also carotenoid deficient" PLANT PHYSIOLOGY, SUPPLEMENT, Bd. 111, Nr. 2, Juni 1996, Seite 40 XP002083334	1-3, 6-12,14, 16,17,21
Y	siehe das ganze Dokument	18-20
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen         </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie         </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist.</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
11. November 1998		27/11/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Holtorf, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03832

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BARTA I C ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXOGENASE FROM MAIZE" PESTICIDE SCIENCE, Bd. 48, Nr. 2, 1996, Seiten 109-116, XP000646540 Seiten 109, 110, linke Spalte; Seite 115	20
X	LENNE C ET AL: "LOCALIZATION AND PARTIAL PURIFICATION OF P-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE FROM CULTURED CARROT CELLS" PHOTOSYNTHESIS: FROM LIGHT TO BIOSPHERE. PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL PHOTOSYNTHESIS CONGRESS, Bd. 5, 20. August 1995, Seiten 285-288, XP000646348 siehe Seite 288	1
Y	"LARGE SCALE TESTING OF 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE FOR THE DETECTION OF NEW HERBICIDAL LEADS" RESEARCH DISCLOSURE, Nr. 393, Januar 1997, Seite 73 XP000693711 siehe das ganze Dokument	18-20
A	NORRIS S R ET AL: "GENETIC DISSECTION OF CAROTENOID SYNTHESIS IN ARABIDOPSIS DEFINES PLASTOQUINONE AS AN ESSENTIAL COMPONENT OF PHYTOENE DESATURATION" PLANT CELL, Bd. 7, Dezember 1995, Seiten 2139-2149, XP002041909 Zusammenfassung, Seite 2140, linke Spalte: Seite 2141, rechte Spalte; Seiten 2142, 2143; Abb. 3, 4, 7	1-24
P, X	KLEBER-JANKE, T. AND KRUPINSKA, K.: "isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions" PLANTA, Bd. 203, November 1997, Seiten 332-340, XP002083335 Zusammenfassung, Seite 337; Seite 339, Abb. 2, 4; Tabelle 2	1
P, X	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31. Juli 1997  Seiten 4, 6, 7-10, 14, 24, 26; Ansprüche	1-3, 6-12, 14, 16-19, 21

-/--

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03832

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 49816 A (DU PONT ;MAXWELL CARL ARTHUR (US); SCOLNIK PABLO ARIEL (US); WITTE) 31. Dezember 1997  Zusammenfassung, Seite 2; Seite 3, Zeile 9-16; Seiten 10,11,14,15; Beispiele -----	1-3, 6-11, 18-20, 22-24
P,X	GARCIA I ET AL: "SUBCELLULAR LOCALIZATION AND PURIFICATION OF A P-HYDROXYPHENYLPYRU-VATE DIOXYGENASE FROM CULTURED CARROT CELLS AND CHARACTERIZATION OF THE CORRESPONDING CDNA" BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 325, Nr. PART 03, 1. August 1997, Seiten 761-769, XP002070560 Seiten 761,764; 763, rechte Spalte; Seite 766, 767; Abb.3 -----	1,2

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03832

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9638567 A	05-12-1996	FR 2734840 A	06-12-1996
		FR 2734841 A	06-12-1996
		FR 2734842 A	06-12-1996
		AU 6228696 A	18-12-1996
		CA 2219979 A	05-12-1996
		CZ 9703809 A	18-03-1998
		EP 0828837 A	18-03-1998
		HR 960245 A	31-08-1997
		PL 323679 A	14-04-1998
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A	20-08-1997
WO 9749816 A	31-12-1997	AU 3644697 A	14-01-1998